

08.06.00

4 日本国特許庁 JP00/3720

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

X2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 6月10日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第163924号

出願人

Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

REC'D 27 JUL 2000

WIPO

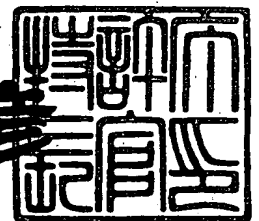
PCT

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3054022

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99073

【提出日】 平成11年 6月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 07/00
C12N 15/12

【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市大浜中町 1 丁 2 番 2 0 号 8 0 8

【氏名】 木村 宏之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市上新田 1 丁目 1 4 番地の 3 0 フレグランス A 1 0 3 号室

【氏名】 坂本 潤一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府寝屋川市大字高宮 5 3 1 番地

【氏名】 澤田 秀和

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規タンパク質およびそのDNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】GABA トランスポーター活性を有する請求項 1 記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 3】請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 4】請求項 1 記載のタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA。

【請求項 5】配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する請求項 4 記載の DNA

【請求項 6】請求項 4 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 7】請求項 6 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 8】請求項 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の製造法。

【請求項 9】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 10】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の GABA トランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 11】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の GABA トランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 12】請求項 10 記載のスクリーニング方法または請求項 11 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3

記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項13】請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質：以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

【0002】

【従来の技術】

抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸（GABA）は、GABA作動性神経から遊離された後、神経終末およびグリア細胞にあるGABAトランスポーターの働きにより細胞外液中から取り除かれる。このGABAトランスポーターによる能動的な取り込み機構が神経伝達終了を決定する最も重要な機構である。

GABAトランスポーターには、4種類のサブタイプ（GAT-1、GAT-2、GAT-3、BGT-1）の存在が知られ、GAT-1とGAT-3は脳、網膜に、GAT-2はほとんどすべての臓器に、BGT-1は腎臓、脳に分布している。GAT-1遺伝子はマウス（Gene Bank accession No.M92378）、ラット（Gene Bank accession No.M33003）、ヒト（Gene Bank accession No.X54673）から、GAT-2遺伝子はマウス（Gene Bank accession No.L04663）、ラット（Gene Bank accession No.M95762）から、GAT-3遺伝子はマウス（Gene Bank accession No.L04662）、ラット（Gene Bank accession No.M95763）から、BGT-1遺伝子はマウス（Gene Bank accession No.M97632）、イヌ（Gene Bank accession No.M80403）からそれぞれクローニングされているが、ヒトGAT-2遺伝子は、これまで知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、(i)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質）、その部分ペプチド、またはそれらの塩、(ii)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質）またはその部分ペプチドをコードするDNA、(iii)該DNAを含有する組換えベクター、(iv)該組換えベクターを保持する形質転換体、(v)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質）またはその塩の製造法、(vi)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、(vii)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質）のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(viii)該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩、および(ix)該化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、マウスやラットのGAT-2と高い相同性を有するヒト由来のGABAトランスポータータンパク質をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解析した後、細胞で発現させることに成功した。そして、本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、

(2) GABAトランスポーター活性を有する上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(5) 配列番号：2で表わされる塩基配列を有する上記(4)記載のDNA、

(6) 上記(4)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(7) 上記(6)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(8) 上記(7)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質またはその塩の製造法、

(9) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、

(10) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(11) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(12) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(13) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のGABAトランスポーター活性を促進また

は阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

【0005】

より具体的には、

(14) タンパク質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である第(1)項記載のGABAトランスポータータンパク質またはその塩、

(15) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と試験化合物とを接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とする上記(10)項記載のスクリーニング方法、

(16) 上記(1)記載のタンパク質を含有する細胞に試験化合物を接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とするGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(17) 上記(7)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した上記(1)記載のタンパク質に試験化合物を接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とする上記(1)記載のタンパク質のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 上記(15)～上記(17)記載のスクリーニング方法で得られる、上記(1)記載のタンパク質のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩、

(19) 上記(15)～上記(17)記載のスクリーニング方法で得られる、上記(1)記載のタンパク質の機能を変化させる化合物またはその塩を含有するこ

とを特徴とする不安、てんかん、精神分裂病などの予防または治療剤、

(20) 上記(9)記載の抗体と、被検液とを接触させることを特徴とする被検液中の上記(1)記載のタンパク質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および

(21) 上記(8)記載の抗体を含有することを特徴とする不安、てんかん、精神分裂病などの予防または治療剤などを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である。

本発明のタンパク質は、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

【0007】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましく

は約 98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

「実質的に同一」とはタンパク質の活性、例えば、輸送体活性（GABAトランスポーター活性）、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたタンパク質は、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

【0008】

また、実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、その活性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

輸送体活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列

、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のタンパク質のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の部分ペプチドとしては、[図1]で示される疎水性プロット解析において、細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（hydrophobic）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを別個に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-COOH$ ）またはカルボキシレート（ $-COO^-$ ）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしもGABAトランスポーター活性を有する必要はない。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthes

is), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0009】

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性(例、GABAトランスポーター活性など)を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、

例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性(例、GABAトランスポーター活性など)を有するタンパク質をコードするDN

Aの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0010】

本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、（1）本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または（2）適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別すること、などが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換（欠失・付加・置換）は、公知のキット、例えば、MutantTM-G（宝酒造（株））、MutantTM-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質を

コードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0011】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0012】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺

伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G41.8耐性）等が挙げられる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0013】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC

1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0014】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエロマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞, HEK293細胞, C127細胞, BALB3T3細胞, Sp-2細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO (dhfr⁻) 細胞、HEK293細胞などが好ましい。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Meth

ods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

発現ベクターの動物細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) 52, 456-467 (1973)]、電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が挙げられる。

このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のタンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のタンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のタンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

【0015】

上記の形質転換体の本発明のタンパク質をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のタンパク質を生成、蓄積せしめることによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生

育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出液、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培

地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃ で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20 % の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃ ~ 40℃ で約 15 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体に本発明のタンパク質を発現させることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100TM などの界面活性剤が含まれていてもよい。

このようにして得られた抽出液中に含まれる本発明のタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利

用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0016】

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明のタンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-aなどの温血動物の骨髓腫細胞などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明のタンパク質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のタンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジ

ン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))またはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原(本発明のタンパク質等抗原)自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0017】

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、トランスジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

特に、本発明のタンパク質の発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なGABAトランスポーター活性を変化させる化合物をスクリーニングすることができ、該化合物を各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質を発現する細胞および本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発

明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明のタンパク質の活性を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のタンパク質等を用いるか、または本発明のタンパク質等の発現系を構築し、該発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いることによって、本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を増強する化合物、あるいは本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を阻害させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に試験化合物を接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能(具体的には、GABAトランスポーター活性)を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

本発明のタンパク質もしくはその塩または本発明のタンパク質の部分ペプチドもしくはその塩と試験化合物とを接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とするスクリーニング方法、

本発明のタンパク質を含有する細胞に試験化合物を接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能(具体的には、GABAトランスポーター活性)を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した本発明のタンパク質に試験化合物を接触させた場合とさせなかった場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能(具体的には、GABAトランスポーター活性)を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のタンパク質等が得られる以前は、例えば、GABAトランスポーター活性を変化させる化合物をスクリーニングする場合、まずラットなどのGABAトランス

ポータータンパク質を含む細胞、組織を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのGABAトランスポーターの活性を変化させる化合物であるか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織をそのまま用いれば他の輸送体タンパク質も混在するために、目的とするGABAトランスポータータンパク質の活性を変化させる化合物を実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来タンパク質を発現する細胞を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、GABAトランスポーター活性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のタンパク質等としては、前記した本発明のタンパク質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のタンパク質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、ヒト由来のタンパク質等を発現させた細胞などが適している。

本発明のタンパク質等を発現させた細胞を構築するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のタンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現に用いる細胞は本発明のタンパク質の発現が確認できるものであれば、いかなる細胞であってもよいが、好ましくは、GABAトランスポーター活性の低い細胞が用いられる。発現したGABAトラン

スポンターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、標識化したGABAの細胞内への取り込み活性の測定の方法（ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of Biological Chemistry）,第267巻,第29号,21098～21104頁（1992年））、標識化したGABA取り込み阻害化合物の細胞への結合活性の測定の方法（ブレイン・リサーチ（Brain Research）,第647巻,231～241頁（1994年））に従って行なうことができる。

より具体的には、まず、本発明のタンパク質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。GABAの取り込みに適当なバッファーに交換した後、試験化合物及び標識化したGABAを添加して一定時間インキュベートさせ、GABAの取り込みに適当なバッファーで洗浄する。その後、細胞に取り込まれた標識化したGABAの量を測定することによりスクリーニングできる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物は、例えば、不安、けいれん、てんかん、精神分裂病、脳血管障害や、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症などに伴う痙性麻痺、緊張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

一方、本発明のタンパク質等の活性を促進する化合物は、例えば、アルツハイマーを含む痴呆症などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどによ

り差異はあるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質等に対する阻害剤を経口投与する場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき該阻害剤を約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質等に対する阻害剤を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合は、一日につき該阻害剤を約0.01～3.0 mg 程度、好ましくは約0.1～2.0 mg 程度、より好ましくは約0.1～1.0 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0018】

（2）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは

は F a b 画分を用いてもよい。本発明のタンパク質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のタンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件

、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質またはその塩を感度良く定量することができる。

【0019】

(3) 中和抗体

本発明の抗体のうち本発明のタンパク質の細胞外領域に結合し、本発明のタンパク質の機能(例えば、GABAトランスポーター活性)を抑制できる中和抗体は、不安、てんかん、精神分裂病などの治療・予防剤として使用することが出来る。本発明の抗体は、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、ヒトまたは温血動物に投与できる。

【0020】

(4) アンチセンスDNA

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質またはDNAの機能を抑制することができるので、不安、てんかん、精神分裂病などの治療・予防剤と

して使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、本発明のアンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のアンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0021】

（5）本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来のプロモーターであって、本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵ヘマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA転移動物を作成できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等に作用する薬剤のスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織

からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

【0022】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0023】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン

Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0024】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル

Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

以下の実施例3で得られたヒトGAT2遺伝子がコードする本発明タンパク質コードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

以下の実施例3で得られたヒトGAT2遺伝子がコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

以下の実施例1で用いられたプライマーHGA2Uの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

以下の実施例1で用いられたプライマーHGA2Lの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

以下の実施例2で用いられたプライマーHGA2-198Lの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

以下の実施例2で用いられたプライマーHGA2-247Lの塩基配列を示す。

【配列番号：7】

以下の実施例2で用いられたプライマーHGA2-1665Uの塩基配列を示す。

【配列番号：8】

以下の実施例2で用いられたプライマーHGA2-1613Uの塩基配列を示す。

【配列番号：9】

以下の実施例2で用いられたプライマーAP-1の塩基配列を示す。

【配列番号：10】

以下の実施例2で用いられたプライマーAP-2の塩基配列を示す。

【配列番号：11】

以下の実施例3で用いられたプライマーHGA2-U2の塩基配列を示す。

【配列番号：12】

以下の実施例3で用いられたプライマーHGA2-L2の塩基配列を示す。

【0025】

後述の実施例4で得られたプラスミドpMCMV-hGAT2を保持する形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pMCMV-hGAT2は、平成11年6月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERMBP-6739として、平成11年4月28日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16286として寄託されている。

【0026】

【実施例】

以下の実施例に記載の遺伝子操作法は、成書(Maniatisら、モレキュラー・クローニング、ColdSpring Harbor Laboratory、1989年)に記載されている方法もしくは試薬の添付プロトコルに記載されている方法に従った。

【0027】

実施例1 ヒトGAT2遺伝子の部分的クローニング

ヒトGAT2遺伝子の部分的なクローニングは、ヒト網膜cDNA(東洋紡, QUICK-Clone cDNA)を鋳型とし、Bordenらが報告(J. Biol. Chem. 267, 21098-21104 (1992))しているラットGAT2遺伝子の塩基配列を参考に作製したプライマーセット

HGA2U 5'-GGT GGG ATG GAT AAC AGG GTC TCG GGA ACG

【配列番号：3】

HGA2L 5'-CCC TAG CAG TTA GAC TCC AGT TCT GTG AGC [配列番号：4]

を用いたPCR法により行った。

PCR 反応は AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いた Hot Start法で行った。下層混液として、10 x LA PCR Buffer 2ml、2.5mM dNTP 溶液 3ml、25mM MgCl₂ 2ml、プライマー溶液 ([配列番号3] 及び [配列番号4]) 各2.5ml、滅菌蒸留水 8mlを混合した。上層混液としては、鋳型としてヒト網膜cDNA(1 ng/ml)を1ml、10x LA PCR Buffer 3ml、2.5mM dNTP 溶液 1ml、25mM MgCl₂ 3ml、TaKaRa LA Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 21.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を 1 個添加し、70℃ で 5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、95℃で2分間処理した。さらに、98℃で10秒間、60℃で30秒間、72℃で2分間のサイクルを 45 回繰り返した後、72℃で8分間処理した。得られたPCR産物をアガロースゲル(1%)電気泳動し、GAT2遺伝子を含む1.8kbのDNA断片をゲルから回収した後、pT7Blue vector(宝酒造)に挿入することによりプラスミドpT7-GAT2を作製した。

pT7-GAT2のPCR断片部分の塩基配列を確認したところ、ラットGAT2遺伝子と類似した配列を有していた。

【0028】

実施例2 ヒトGAT2遺伝子の5' 及び3' 領域のクローニング

実施例1で得られたPCR断片の配列の5' 及び3' 領域部分はラットGAT2遺伝子の配列である。よって、ヒトGAT2遺伝子の5' 及び3' 領域をクローニングするため、網膜及び腎臓cDNA(東洋紡, Marathon Ready cDNA)を 鋳型とし、pT7-GAT2の塩基配列を参考に作製した特異的プライマーセット

HGA2-198L 5'-GCA CCT CCC CCA TTT TTG TAG CAG [配列番号：5]

HGA2-247L 5'-GAC AGG AAT GCC ACA GGT AAA GAG [配列番号：6]

HGA2-1665U 5'-CTC TAC AGA CTC GGA ACC CTC AAG [配列番号：7]

HGA2-1613U 5'-CCT GGG CTG GCT CCT GGC TCT GTC [配列番号：8]

及びMarathon Ready cDNAに添付されているプライマーセット

AP-1 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC [配列番号：9]

AP-2 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC

[配列番号:10]

を用いたRACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によるnested PCR法で行った。

5'領域の1回目のPCR 反応は AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いた Hot Start法で行った。下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-247L [配列番号:6] 及びAP-1 [配列番号:9])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型としてヒト網膜及び腎臓cDNAを5ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 20.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を 1個添加し、70℃ で 5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。次いで、得られたPCR産物を鋳型としたnested PCRを行った。すなわち、下層混液として、10x LA PCR Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、25mM MgCl₂ 2ml、プライマー溶液(HGA2-198L [配列番号:5] 及びAP-2 [配列番号:10])各 1ml、滅菌蒸留水 11mlを混合した。上層混液としては、鋳型として5'領域のHGA2-247L及びAP-1のPCR産物を1ml、10x LA PCR Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、25mM MgCl₂ 3ml、TaKaRa LA Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 21.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。

3'領域の1回目のPCR反応は AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いた Hot Start法で行った。下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2 ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-1613U [配列番号:8] 及びAP-1 [配列

番号：9])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型としてヒト網膜及び腎臓cDNAを5 ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 20.5 mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を 1 個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。次いで、得られたPCR産物を鋳型としたnested PCRを行った。すなわち、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-1665U [配列番号：7] 及びAP-2 [配列番号：10])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型として3' 領域のHGA2-1613U及びAP-1のPCR産物を1ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3 ml、2.5 mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 24.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。

得られたそれぞれのPCR産物のダイレクトシーケンスを行った結果、ラットGAT2遺伝子の5' 及び3' 領域と類似した配列を有していた。

【0029】

実施例3 ヒトGAT2遺伝子全長のクローニング

ヒトGAT2遺伝子全長のクローニングは、ヒト腎臓QUICK-Clone cDNA(東洋紡)とヒト網膜及び腎臓Marathon Ready cDNA(東洋紡)の異なる3種類の鋳型を用いて、実施例2で得られた5' 及び3' 領域の塩基配列を参考に作製した特異的プライマーセット

HGA2-U2 5'-GGC AGC GCT AGC AGG TCT GGC AGC AGC TTC ACT AAG [配列番号：1

1]

HGA2-L2 5'-TCA CCA GTC GAC GGC ACA CAG GCA CCA TCC AAG GGC [配列番号 : 12]

によりPCR法を行った。

PCR反応はAmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いたHot Start法で行った。ヒト腎臓QUICK-Clone cDNA(東洋紡)を鋳型とした場合、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液3ml、プライマー溶液 ([配列番号11] 及び [配列番号12]) 各1ml、滅菌蒸留水13mlを混合した。上層混液としては、鋳型1ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水24.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。ヒト網膜及び腎臓Marathon Ready cDNA (東洋紡)を鋳型とした場合、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液3ml、プライマー溶液各1ml、滅菌蒸留水13mlを混合した。上層混液としては、鋳型を5ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水20.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットした後、95℃で2分間処理した。さらに、98℃で10秒間、60℃で30秒間、72℃で2分間のサイクルを45回繰り返した後、72℃で8分間処理した。それぞれの得られたPCR産物をアガロースゲル(1%)電気泳動し、ヒト GAT2遺伝子を含む1.8kbのDNA断片をゲルから回収した後、pT7Blue vector (宝酒造)に挿入することによりヒト腎臓QUICK-Clone cDNA由来のpT7-hGAT2 No.1-11、ヒト腎臓Marathon Ready cDNA由来のpT7-hGAT2 No.3-6及びヒト網膜Marathon Ready cDNA由来のpT7-hGAT2 No.4-13を作製した。

3種類の異なる鋳型由来のPCR断片部分の塩基配列は、すべて一致したことからヒトGAT2遺伝子 [配列番号 : 2] を取得したことを確認した。

【0030】

実施例4 ヒトGAT2発現用プラスミドの作製

プラスミドpMCMVneoの5.6Kb *NheI*-*SalI*断片と実施例3記載のプラスミドpT7-hGAT2 No.4-13のヒトGAT2遺伝子を含む1.8Kb *NheI*-*SalI*断片を連結し、プラスミドpMCMV-hGAT2を作製した。

プラスミドpMCMV-hGAT2を用いて大腸菌*Escherichia coli* DH5 α 株を形質転換して*Escherichia coli* DH5 α /pMCMV-hGAT2を得た。

【0031】

実施例5 ヒトGAT2発現用プラスミドのLM(TK⁻)細胞への導入と発現細胞の取得

10% ウシ胎児血清(ライフテックオリエンタル)を含むDMEM培地(ライフテックオリエンタル)を用いてティッシュカルチャーフラスコ750ml(コーニング)で生育させたLM(TK⁻)細胞を0.5g/Lトリプシン-0.2g/L EDTA(ライフテックオリエンタル)処理によりで剥がした後、細胞をPBS(ライフテックオリエンタル)で洗浄して遠心(1000rpm,5分)し、PBSで懸濁した。次に、ジーンパルサー(バイオラッド社)を用いて、下記の条件に従って、DNAを細胞に導入した。即ち、0.4cmギャップのキュベットに 8×10^6 細胞と10mgの発現用プラスミドpMCMV-hGAT2を加え、電圧0.25kV、キャパシタンス960mF下でエレクトロポレーションした。その後、10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地に細胞を移し、24時間培養し、再び細胞を剥がして遠心し、次に、ジェネティシン(ライフテックオリエンタル)を500mg/mlに加えた10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地で懸濁し、 10^4 細胞/mlとなるように希釈して96ウェルプレート(ベクトンディキンソン)に播種して、37℃の炭酸ガスインキュベーター中で培養することによりジェネティシン耐性形質転換株を得た。

ついで、GAT2発現を以下の方法で確認した。すなわち、得られた形質転換株を96ウェルプレート(コーニング)で培養した後、GABA取り込み用Buffer(150mM NaCl、20mM HEPES、1mM CaCl₂、10mM Glucose、5mM KCl、1mM MgCl₂、pH7.4に調製)に置換し、50nM [³H]-GABA添加により、[³H]-GABAが取り込まれる細胞株、hGAT2/LM(TK⁻)を選択した(図2)。

【0032】

【配列表】

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Peptide and its DNA

<130> A99073

<160> 12

<210> 1

<211> 602

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Ser Arg Val Ser Gly Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Lys Pro

1

5

10

15

Val Tyr Pro Val Met Glu Lys Lys Glu Glu Asp Gly Thr Leu Glu Arg

20

25

30

Gly His Trp Asn Asn Lys Met Glu Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Glu

35

40

45

Ile Ile Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys

50

55

60

Asn Gly Gly Gly Ala Phe Phe Ile Pro Tyr Leu Val Phe Leu Phe Thr

65

70

75

80

Cys Gly Ile Pro Val Phe Leu Leu Glu Thr Ala Leu Gly Gln Tyr Thr

85

90

95

Ser Gln Gly Gly Val Thr Ala Trp Arg Lys Ile Cys Pro Ile Phe Glu

100

105

110

Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Gln Met Ile Val Ile Leu Leu Asn Val Tyr

115

120

125

Tyr Ile Ile Val Leu Ala Trp Ala Leu Phe Tyr Leu Phe Ser Ser Phe

130	135	140	
Thr Ile Asp Leu Pro Trp Gly Gly Cys Tyr His Glu Trp Asn Thr Glu			
145	150	155	160
His Cys Met Glu Phe Gln Lys Thr Asn Gly Ser Leu Asn Gly Thr Ser			
165	170	175	
Glu Asn Ala Thr Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Arg Val Leu			
180	185	190	
Lys Ile Ser Asp Gly Ile Gln His Leu Gly Ala Leu Arg Trp Glu Leu			
195	200	205	
Ala Leu Cys Leu Leu Leu Ala Trp Val Ile Cys Tyr Phe Cys Ile Trp			
210	215	220	
Lys Gly Val Lys Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe			
225	230	235	240
Pro Tyr Leu Met Leu Val Val Leu Leu Ile Arg Gly Val Thr Leu Pro			
245	250	255	
Gly Ala Ala Gln Gly Ile Gln Phe Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg			
260	265	270	
Leu Trp Asp Pro Gln Val Trp Met Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe			
275	280	285	
Ser Phe Ala Ile Cys Leu Gly Cys Leu Thr Ala Leu Gly Ser Tyr Asn			
290	295	300	
Lys Tyr His Asn Asn Cys Tyr Arg Asp Cys Ile Ala Leu Cys Phe Leu			
305	310	315	320
Asn Ser Gly Thr Ser Phe Val Ala Gly Phe Ala Ile Phe Ser Ile Leu			
325	330	335	
Gly Phe Met Ser Gln Glu Gln Gly Val Pro Ile Ser Glu Val Ala Glu			
340	345	350	
Ser Gly Pro Gly Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Arg Ala Val Val Met			
355	360	365	

Leu Pro Phe Ser Pro Leu Trp Ala Cys Cys Phe Phe Phe Met Val Val
 370 375 380
 Leu Leu Gly Leu Asp Ser Gln Phe Val Cys Val Glu Ser Leu Val Thr
 385 390 395 400
 Ala Leu Val Asp Met Tyr Pro His Val Phe Arg Lys Lys Asn Arg Arg
 405 410 415
 Glu Val Leu Ile Leu Gly Val Ser Val Val Ser Phe Leu Val Gly Leu
 420 425 430
 Ile Met Leu Thr Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr
 435 440 445
 Tyr Ala Ala Ser Gly Met Cys Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Glu Ser
 450 455 460
 Leu Cys Val Ala Trp Val Tyr Gly Ala Lys Arg Phe Tyr Asp Asn Ile
 465 470 475 480
 Glu Asp Met Ile Gly Tyr Arg Pro Trp Pro Leu Ile Lys Tyr Cys Trp
 485 490 495
 Leu Phe Leu Thr Pro Ala Val Cys Thr Ala Thr Phe Leu Phe Ser Leu
 500 505 510
 Ile Lys Tyr Thr Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Lys Tyr Thr Tyr Pro Trp
 515 520 525
 Trp Gly Asp Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys
 530 535 540
 Ile Pro Ala Trp Ser Leu Tyr Arg Leu Gly Thr Leu Lys Gly Pro Phe
 545 550 555 560
 Arg Glu Arg Ile Arg Gln Leu Met Cys Pro Ala Glu Asp Leu Pro Gln
 565 570 575
 Arg Asn Pro Ala Gly Pro Ser Ala Pro Ala Thr Pro Arg Thr Ser Leu
 580 585 590
 Leu Arg Leu Thr Glu Leu Glu Ser His Cys

595

600

<210> 2

<211> 1806

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGGATAGCA GGGTCTCAGG CACAACCAGT AATGGAGAGA CAAAACCAGT GTATCCAGTC	60
ATGGAAAAGA AGGAGGAAGA TGGCACCCTG GAGCGGGGGC ACTGGAACAA CAAGATGGAG	120
TTTGTGCTGT CAGTGGCTGG GGAGATCATT GGCTTAGGCA ACGTCTGGAG GTTTCCTAT	180
CTCTGCTACA AAAATGGGGG AGGTGCCTTC TTCATCCCCT ACCTCGTCTT CCTCTTTACC	240
TGTGGCATTG CTGTCTTCCT TCTGGAGACA GCACTAGGCC AGTACACTAG CCAGGGAGGC	300
GTCACAGCCT GGAGGAAGAT CTGCCCCATC TTTGAGGGCA TTGGCTATGC CTCCCAGATG	360
ATCGTCATCC TCCTCAACGT CTACTACATC ATTGTGTTGG CCTGGGGCCT GTTCTACCTC	420
TTCAGCAGCT TCACCATCGA CCTGCCCTGG GGCGGTGCT ACCATGAGTG GAACACAGAA	480
CACTGTATGG AGTTCCAGAA GACCAACGGC TCCCTGAATG GTACCTCTGA GAATGCCACC	540
TCTCCTGTCA TCGAGTTCTG GGAGCGGCGG GTCTTGAAGA TCTCTGATGG GATCCAGCAC	600
CTGGGGGCCC TGCCTGGGA GCTGGCTCTG TGCCCTCTGC TGGCCTGGGT CATCTGCTAC	660
TTCTGCATCT GGAAGGGGGT GAAGTCCACA GGCAAGGTGG TGTACTTCAC GGCCACATTT	720
CCTTACCTCA TGCTGGTGGT CCTGTTAATT CGAGGGGTGA CGTTGCCTGG GGCAGCCCAA	780
GGAATTCAGT TTTACCTGTA CCCAAACCTC ACGCGTCTGT GGGATCCCCA GGTGTGGATG	840
GATGCAGGCA CCCAGATATT CTTCTCCTTC GCCATCTGTC TTGGGTGCCT GACAGCCCTG	900
GGCAGCTACA ACAAGTACCA CAACAACCTG TACAGGGACT GCATCGCCCT CTGCTTCCTC	960
AACAGCGGCA CCAGCTTTGT GGCCGGCTTT GCCATCTTCT CCATCCTGGG CTTCATGTCT	1020
CAGGAGCAGG GGGTGCCCAT TTCTGAGGTG GCCGAGTCAG GCCCTGGCCT GGCTTTCATC	1080
GCTTACCCGC GGGCTGTGGT GATGCTGCCC TTCTCTCCTC TCTGGGCCTG CTGTTTCTTC	1140
TTCATGGTCG TTCTCCTGGG ACTGGATAGC CAGTTTGTGT GTGTAGAAAG CCTGGTGACA	1200
GCGCTGGTGG ACATGTACCC TCACGTGTTT CGCAAGAAGA ACCGGAGGGA AGTCCTCATC	1260
CTTGGAGTAT CTGTCGTCTC CTTCTTGTG GGGCTGATCA TGCTCACAGA GGGCGGAATG	1320
TACGTGTTCC AGCTCTTTGA CTACTATGCG GCCAGTGGCA TGTGCCTCCT GTTCGTGGCC	1380

ATCTTCGAGT CCCTCTGTGT GGCTTGGGTT TACGGAGCCA AGCGCTTCTA CGACAACATC 1440
 GAAGACATGA TTGGGTACAG GCCATGGCCT CTTATCAAAT ACTGTTGGCT CTTCTCACA 1500
 CCAGCTGTGT GCACAGCCAC CTTTCTCTTC TCCCTGATAA AGTACACTCC GCTGACCTAC 1560
 AACAAGAAGT ACACGTACCC GTGGTGGGGC GATGCCCTGG GCTGGCTCCT GGCTCTGTCC 1620
 TCCATGGTCT GCATTCCTGC CTGGAGCCTC TACAGACTCG GAACCCTCAA GGGCCCCTTC 1680
 AGAGAGAGAA TCCGTCAGCT CATGTGCCCCA GCCGAGGACC TGCCCCAGCG GAACCCAGCA 1740
 GGACCCTCGG CTCCCGCCAC CCCCAGGACC TCACTGCTCA GACTCACAGA GCTAGAGTCT 1800
 CACTGC 1806

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 30

GGTGGGATGG ATAACAGGGT CTCGGGAACG

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

CCCTAGCAGT TAGACTCCAG TTCTGTGAGC

30

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GCACCTCCCC CATTITTGTA GCAG

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

GACAGGAATG CCACAGGTAA AGAG

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CTCTACAGAC TCGGAACCCT CAAG

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

CCTGGGCTGG CTCCTGGCTC TGTC

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

GGCAGCGCTA GCAGGTCTGG CAGCAGCTTC ACTAAG

36

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

TCACCAGTCG ACGGCACACA GGCACCATCC AAGGGC

36

【0033】

【発明の効果】

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、トランスジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

【0034】

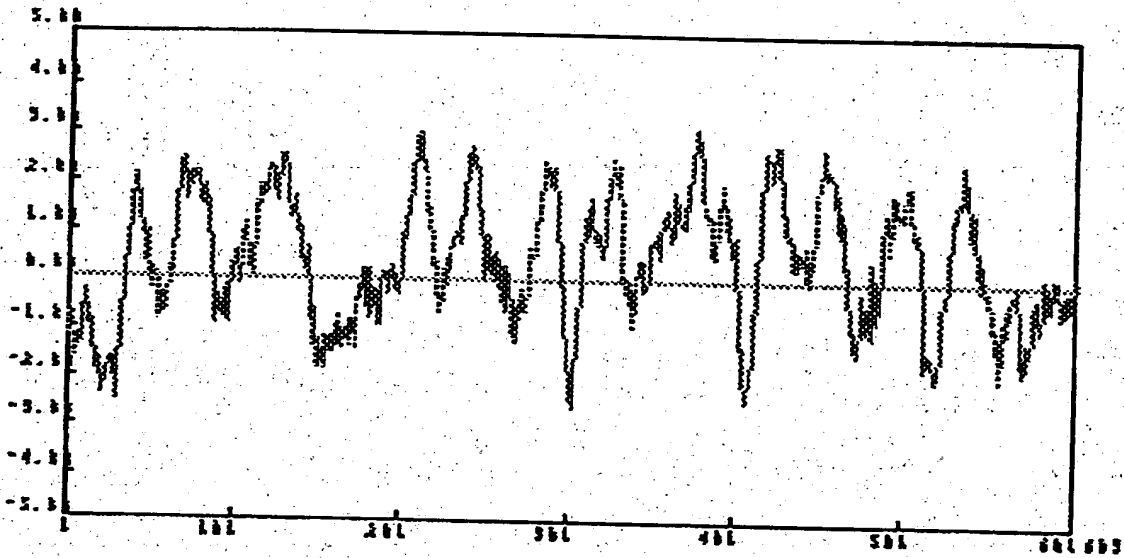
【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例で得られた、本発明のヒト由来タンパク質のアミノ酸配列をもとに作成した、疎水性プロットを示す。

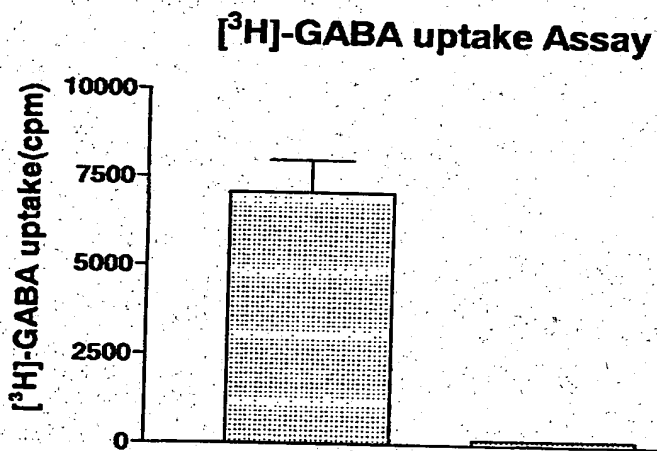
【図2】 本発明のタンパク質を発現させたhGAT2/LM(TK⁻)細胞にナトリウムイオンと塩素イオンを含むバッファー中で [³H]-GABAを添加した後、取り込まれたラベル体の増加量を測定した結果を示す。左側のグラフはhGAT2/LM(TK⁻)は、本発明のヒト由来タンパク質を発現させたLM(TK⁻)細胞を示し、右側のグラフはMock/LM(TK⁻)は、プラスミドpMCMVneoを導入したLM(TK⁻)細胞を示す。左側の数字は、hGAT2/LM(TK⁻)細胞にナトリウムイオンと塩素イオンを含むバッファー中で50nM [³H]-GABAを添加した後、ラベル体の取り込み量を測定した結果を示す。データは平均値±標準誤差として表した。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規タンパク質およびその用途の提供。

【解決手段】 本発明は、GABAトランスポーター活性を有するのタンパク質またはその塩などに関する。

【効果】 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、トランスジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名 武田薬品工業株式会社